

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-194743  
 (43)Date of publication of application : 14.07.1992

(51)Int.CI. G01N 27/62  
 H01J 49/00

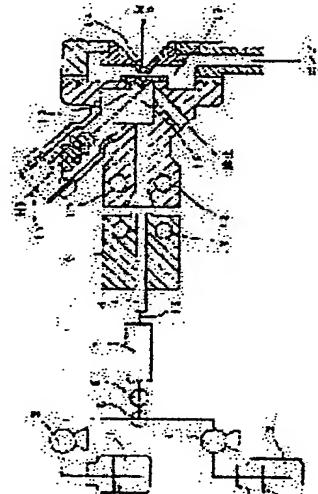
(21)Application number : 02-327668 (71)Applicant : HITACHI LTD  
 (22)Date of filing : 28.11.1990 (72)Inventor : KATO YOSHIAKI

## (54) MASS SPECTROMETRY OF ORGANIC POLAR COMPOUND

## (57)Abstract:

PURPOSE: To separate and analyze an unmodified compound of sugar and others as they are by producing negative ions of halogen by mixing a halogen-containing compound in a chemical ion source, and by utilizing an addition reaction of these negative ions of halogen with an organic polar compound.

CONSTITUTION: Methanol and chloroform stored in solvent storage bottles 1 and 2 are sent out by pumps 3 and 4, mixed by a mixer 5 and sent to a column 7 through an injector 6. A sample solution is introduced from the injector 6, separated by the column 7 and then sent to an atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) interface element by a plastic tube 15. The APCI interface element is provided with an atomizer 9, a solvent removing chamber 10, a differential exhaust system element 17, etc. The solution flowing out of a liquid chromatograph is atomized by the atomizer 9 and sent into the solvent removing chamber 10, and vaporized solvent molecules are ionized by corona discharge generated by a high voltage impressed on a needle electrode 11.  $\text{CH}_3\text{O}^-$  ions and the like produced from the methanol, attach molecules of the chloroform and, as the result,  $\text{Cl}^-$  ions are produced.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of

rejection or application converted  
registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2667576号

(45)発行日 平成9年(1997)10月27日

(24)登録日 平成9年(1997)6月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 27/62  
H 0 1 J 49/10

識別記号 庁内整理番号

F I  
G 0 1 N 27/62  
H 0 1 J 49/10

技術表示箇所

V

請求項の数 4(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平2-327668  
(22)出願日 平成2年(1990)11月28日  
(65)公開番号 特開平4-194743  
(43)公開日 平成4年(1992)7月14日

(73)特許権者 99999999  
株式会社日立製作所  
東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地  
(72)発明者 加藤 義昭  
茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会  
社日立製作所那珂工場内  
(74)代理人 弁理士 高橋 明夫 (外1名)  
審査官 鈴木 傑光  
(56)参考文献 特開 昭61-99865 (J P, A)  
特開 昭63-113340 (J P, A)  
実開 平2-105161 (J P, U)  
米国特許4891515 (U S, A)

(54)【発明の名称】 有機極性化合物の質量分析法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】大気圧下で極性有機溶媒と、有機極性化合物試料を測定装置のイオン源に導入し、大気圧化学イオン化することにより前記試料分子をイオン化し、マススペクトルを測定する質量分析法において、前記有機極性化合物試料が水酸基またはカルボキシル基を有する有機極性化合物で、前記極性有機溶媒が負イオンを形成する極性有機溶媒から選ばれ、ハロゲンイオンを生成する含ハロゲン化合物を前記有機溶媒と有機極性化合物試料に前記イオン源中で混合させた後、大気圧化学イオン化法によりイオン化することにより、前記有機溶媒イオンと含ハロゲン化合物とのイオン分子反応によりハロゲン負イオンを生成させ、前記ハロゲン負イオンと前記有機極性化合物試料分子との付加反応により該試料分子をイオン化して質量分析す

ることを特徴とする有機極性化合物の質量分析法。

【請求項2】前記イオン源におけるイオン化にコロナ放電を用いる請求項1に記載の有機極性化合物の質量分析法。

【請求項3】前記イオン源に導入される極性有機溶媒、有機極性化合物試料および含ハロゲン化合物は、液体クロマトグラフを経由して供給するようにした請求項1または2に記載の有機極性化合物の質量分析法。

【請求項4】前記ハロゲンイオンを生成する含ハロゲン化合物がクロロフォルムである請求項1, 2または3に記載の有機極性化合物の質量分析法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は化学イオン化による有機極性化合物の質量分析法に関し、特に、糖類やアルコール類などの有機極性

化合物の質量分析法に関する。

[従来の技術]

糖類等の炭水化物は、植物、動物の細胞中に広く存在し、生化学上重要な役割を果しており、これらの分析は生化学上極めて重要である。

しかし前記化合物の分析計は一般に非常に手数がかかるつたり、測定感度が不充分であつたりして問題が多かつた。そのため、簡単で高感度な分析手法が求められていた。GC (ガスクロマトグラフィ) , GC/MS (質量分析) , HPLC (高圧液体クロマトグラフィ) や質量分析を利用したFABやLC/MS法が開発された。

糖類やアルコールなどは熱的に不安定であり、そのままでは揮発性が乏しいために、GC, GC/MS等の測定は揮発性を高め、熱安定性を増す誘導体化処理なしに分析はできない。一方HPLCは必ずしも誘導体化処理を必要としない。しかし、糖類や炭水化物類は一般に紫外や可視領域に吸収を持つていない。近紫外 ( $\sim 200\text{nm}$ ) 領域を利用すれば、これら化合物の検出は可能と考えられるが、實際にはHPLCに使用される緩衝液からの妨害で、測定不能となる。そのためHPLCにおいても、紫外領域に吸収を与えるべくこれら化合物はプリまたはポストカラムラベリング (誘導体化) が行われている。

本田らは陰イオン交換クロマトグラフィを用い、ホウ酸錯体のポストカラムラベリング法により糖類の高感度分析ができるとを報告している [Anal. Biochem. vol. 281, pp340 (1983)]。

[発明が解決しようとする課題]

しかし、HPLCは単に保持時間を与えるのみで構造や分子量の情報を得ることはできない。

質量分析において、糖類は専らソフトイオン化、例えばSIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry; 二次イオンマススペクトロメトリ) , FD (Field Desorption; 電解離イオン化) またはLD (Lesar Desorption; レーザ脱離イオン化) を用いて分析されてきた。これらソフトイオン化はいずれも分析情報を充分に与えてくれた。しかし、生体内に存在する糖類は一般に混合物で存在するため、上記分析法に先立つて試料の厳密な分離、精製が必要となる。

HPLC/MS、またはLC/MSは生体物質の分析の強力な武器として登場した。それは、これらが不揮発性、熱不安定物質の分離、イオン化が誘導体化なしに達成できるためである。いくつかの糖類がサーモスプレイLC/MSで測定が試みられた。この手法で得られたマススペクトル中には多くのフラグメントイオンおよび擬分子イオン ( $M + H$ )<sup>+</sup>や ( $M + NH_4$ )<sup>+</sup>などが出現している。しかし、このサーモスプレイLC/MS法も、三糖類やそれ以上の多糖類は測定できなかった。

これら化合物においてグリコシル結合が試薬イオンの攻撃を受け、その結果フラグメントイオンが優勢にな

る。そのため、擬分子イオンがほとんど消滅する。また、単純な化学イオン化でなく、例えば熱によるアセチル化などの副次的反応物の生成によってマススペクトルは解析困難なほど複雑となる。坂入や神原はイオン化法の一つである大気圧スプレイ法で多くの糖類の分子イオンを与えることに成功した [Anal. Chem. vol. 61 pp1159 (1989)]。500°C以上で噴霧するだけでアルカリ金属付加イオンを与えることができた。しかし、この大気圧スプレイ法においても、有機溶媒中心の溶離液の場合は、必ずしも好結果を与えるなかった。

大気圧下で化学イオン化を行う大気圧化学イオン化法 (APCI) もサーモスプレイ法と同じく三糖類以上では分子量の情報を与えなかった。

本発明の目的は、混合物として存在する糖類等の化合物を無修飾のまま分離し、質量分析する有機極性化合物の質量分析法を提供するものである。

[課題を解決するための手段]

前記課題を解決する本発明の要旨は次のとおりである。

大気圧下で極性有機溶媒と、有機極性化合物試料を測定装置のイオン源に導入し、大気圧化学イオン化することにより前記試料分子をイオン化し、マススペクトルを測定する質量分析法において、

前記有機極性化合物試料が水酸基またはカルボキシル基を有する有機極性化合物で、前記極性有機溶媒が負イオンを形成する極性有機溶媒から選ばれ、

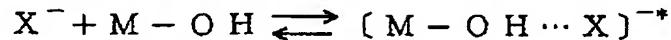
ハロゲンイオンを生成する含ハロゲン化合物を前記有機溶媒と有機極性化合物試料に前記イオン源中で混合させた後、大気圧化学イオン化法によりイオン化することにより、前記有機溶媒イオンと含ハロゲン化合物とのイオン分子反応によりハロゲン負イオンを生成させ、

前記ハロゲン負イオンと前記有機極性化合物試料分子との付加反応により該試料分子をイオン化して質量分析することを特徴とする有機極性化合物の質量分析法にある。化学イオン化には正および負イオン化学イオン化がある。負イオン化学イオン化における主なイオン化プロセスには以下のものが知られている。

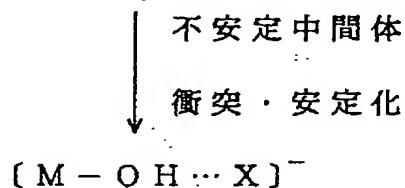
- (1) プロトン移動反応
- (2) 負イオン付加反応
- (3) 求核反応
- (4) 電荷移動反応

特に、プロトン移動反応および負イオン付加反応は実際的なTSP法 (サーモスプレイ法) やAPCI法 (大気圧化学イオン化法) において重要な反応である。F-イオンやCl-イオンは負イオンCIマススペクトルを与える重要な試薬イオンとして用いられてきた。この場合、ハロゲン化炭化水素とメタンなどの混合ガスが試薬ガスとして用いられている。ハロゲン負イオン (例えばCl<sup>-</sup>) は水酸基やカルボキシル基などを有する有機極性化合物と気相

で衝突すると、一旦、過剰な運動エネルギーを持つ中間体が作られる。この中間体は、続いて他の分子との衝突により過剰な運動エネルギーを失い、安定な付加イオンとなる。ハロゲン負イオンと水酸基やカルボキシル基をもつた化合物は、水素結合により安定な付加イオンを生成する。大気圧～数10Pa下では分子間の衝突は頻繁に起



こり、負付加イオンは安定に数多く生成される。ハロゲン負イオンと中性分子の衝突ではプロトンの授受によるイオン化（プロトン移動反応）が起きる可能性も考えられるが、ハロゲン負イオンの共役酸（例えばCl<sup>-</sup>負イオンに対するHCl）は強酸のため中性分子からCl<sup>-</sup>へのプロトン移動は起きない。



### ハロゲン付加イオン

ハロゲン負イオンは例えば塩酸などをLCの移動相に混入すれば得られる。しかし、塩酸などの強酸はLCポンプやその他の機器を腐食してしまうため一般に使用できない。

また溶液のPHはLCの分離を大きく左右するため前記イオン化のために、自由に塩酸を混入することはできない。また塩化アンモニウムなどの塩を混入することもできるが、この場合移動相の極性を高め、高極性物質の保持に影響を与えることになる。そのため、溶媒はLCポンプ、カラム、検出器等にある状態ではハロゲンイオンなどを解離せず、LC/MSの化学イオン化イオン源中でハロゲンイオンを生成し、付加イオンを作るものが好ましい。

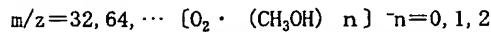
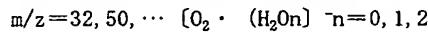
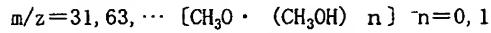
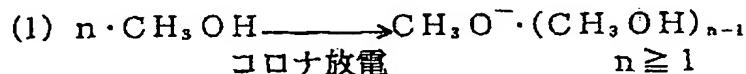
こうした含ハロゲン化合物としては、例えば、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、トリクロロエチレン等があり、中でもクロロホルムが化学イオン化で塩素イオンを容易に生成することから最も好ましい。

#### 【作用】

本発明の作用を図面を用いて説明する。

第2図にメタノールの負イオン大気圧化学イオン化（Negative Ion-Atmospheric Pressure Chemical Ionization, NI-APCI）マススペクトルを示す。

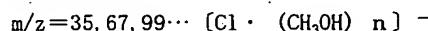
マススペクトル中に出現した各ピークは以下のように解釈できる。



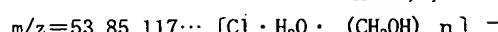
ここで、O<sub>2</sub>やH<sub>2</sub>Oは噴霧の際に取り込まれた空気中の酸素、水によるものと思われる。

第3図はメタノール：クロロホルムの95:5の混合溶液をAPCIイオン源に導入して得られたNI-APCIマススペクトルである。

このマススペクトル中には2つのイオン種グループが観察される。



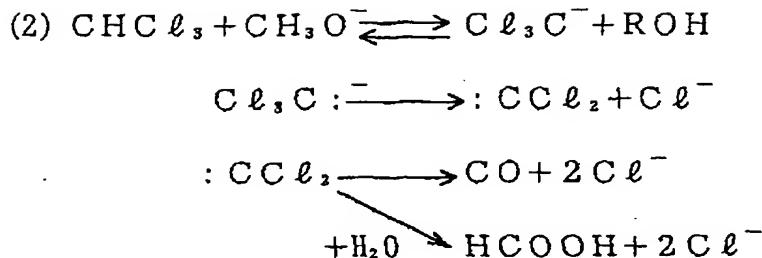
$$n = 0, 1, 2 \dots$$



$$n = 0, 1, 2 \dots$$

メタノールとクロロホルムをAPCIイオン源に導入することでCl<sup>-</sup>イオンを生成させることができた。

ハロゲン化炭化水素（特にクロロホルム）は強塩基（例えばOH<sup>-</sup>やCH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>など）と反応しハロゲン負イオンを生成することが知られている。ここで、メタノールからコロナ放電で生成したCH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>イオンなど塩基がクロロホルム分子を攻撃しCl<sup>-</sup>イオンを生成することが明らかとなつた。この反応は溶液中ではよく知られている反応である。



生成したハロゲン負イオンは水酸基などを有する化合物と衝突し、ハロゲン付加イオンを生成する。一般に衝突安定化後の付加イオンは安定で、それ以上のフラグメントーションは生じない。そのため分子量情報が得られ易くなる。またハロゲンイオンとして  $\text{Cl}^-$  を用いる別の利点が生ずる。それは  $\text{Cl}$  元素が安定同位体 ( $^{35}\text{Cl}$ : $^{37}\text{Cl}$  = 3:1) を持つため、 $\text{Cl}^-$  付加イオンは  $\text{Cl}$  元素のアイソトープ比 (3:1) を示し、同定が簡単になる。

第4図にLC移動相としてメタノール:クロロホルム (95:5) を用いて、移動相と同じ組成の溶液に溶かした Sucrose を APCI イオン源に  $1 \mu\text{g}$  導入して得られたマススペクトルを示す。

擬分子イオン  $\text{m/z} 377$  ( $\text{M} + \text{Cl}^-$ ) が基準ピークとなっている。他に弱いピーク

$[\text{M} + \text{Cl} + \text{CH}_3\text{OH}]^-$	$\text{m/z} 409$
$[\text{M} + \text{Cl} + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{OH}]^-$	$\text{m/z} 427$
$[\text{M} - \text{H}]^-$	$\text{m/z} 341$

が観察される。

$\text{m/z} 150$  から  $320$  には低強度のフラグメントイオンがいくつか観察される。これによりクロロホルム:メタノール混合溶液の導入とコロナ放電 APCI で水酸基を有する有機極性化合物の塩素イオン付加イオンを作ることができた。

$\text{Cl}^-$  イオンの供給源としてどの溶媒が優れているかの検討結果を第5図に示す。

Sucrose を水:メタノール (50:50) に溶かし、 $1 \mu\text{g}$  の Sucrose を三つの混合溶媒を変更しながら導入した。三つの混合溶媒は四塩化炭素、塩化メチレン、クロロホルム各 5% メタノール溶液である。この 3 つの系の中でクロロホルム-メタノール系が最高感度を与えた。塩化メチレン:メタノール系の 8 倍、四塩化炭素・メタノール系の 1000 倍であった。これは溶液中の塩基に対する反応性の傾向とよく一致する。これから、この 3 つの含塩素溶媒の中ではクロロホルムが最適であることが分かる。

第6図 A にクロロホルムの濃度がどの程度であれば糖類の分析ができるかの検討結果を示す。

濃度の異なるクロロホルム-アセトニトリル混合溶液 3 種を用意し、濃度を順次変えた Sucrose 溶液を注入した。第6図 A において、縦軸は Sucrose の  $[\text{M} + \text{Cl}^-]$  イオン電流値、横軸は Sucrose の導入量を表す。第6図 A に示すとおり、クロロホルム濃度 0.5%、程度あれば 1

$0 \mu\text{g}$  程度以上まで応答できることがわかる。メタノールやアセトニトリルまたは水などに対して 1% 程度であれば充分クロロホルムは溶解する。

第6図 B に 0.5% クロロホルム/アセトニトリルを用い糖の種類を変えた時の  $[\text{M} + \text{Cl}^-]$  イオンの応答を示す。個々の糖により、応答の度合は異なっている全てが 1ng から 100ng まで直線関係が得られている。

#### [実施例]

以下、本発明の一実施例を第1図により説明する。

ここでは液体クロマトグラフ (LC) と直結した大気圧化学イオン化質量分析装置 (LC/APCI-MS) の例を示す。

溶媒貯蔵ビン 1, 2 に貯えられたメタノールとクロロホルムはポンプ 3, 4 で送り出され、ミキサー 5 で混合されインジェクタ 6 を経てカラム 7 に送られる。試料溶液はインジェクタ 6 から導入されカラム 7 で分離後、プラスチックチューブ 15 で大気圧化学イオン化 (APCI) インターフェース部へ送られる。APCI インターフェースは霧化器 9、脱溶媒室 10、APCI イオン源 16、差動排気系部 17 などで構成される。霧化器 9 と脱溶媒室はカートリッジヒータ 12 で独立に加熱制御できるようになっている。霧化器は内径 0.1mm  $\phi$  の金属製のキャピラリー 8 がヒートブロックに溶接されている。

LC から流出した溶液は霧化器に到達し、一気にキャピラリー先端より霧となつて噴出する。霧化器の温度は 20  $^{\circ}\text{C}$  ~ 300  $^{\circ}\text{C}$  に設定される。生成した霧は内径 5mm の穴がある 400  $^{\circ}\text{C}$  に加熱された脱溶媒室に入り、霧の気化が促進される。気化した溶媒分子は、ニードル電極 11 に印加された高電圧 (3kV ~ 5kV) によって発生したコロナ放電でイオン化される。

メタノールから生成した  $\text{CH}_3\text{O}^-$  イオンなどはクロロホルム分子  $\text{CHCl}_3$  を攻撃し、結果として  $\text{Cl}^-$  イオンを生成する。 $\text{Cl}^-$  イオンは更に糖などの分子 M と衝突し、付加イオン  $[\text{M} + \text{Cl}^-]$  を作る。生成した付加イオンは第 1 細孔 13 から差動排気系部に入り、中性の溶媒分子などは真空ポンプで取り除かれる。なお APCI イオン源部 16 で反応に参加しなかった溶媒は、排出口よりインターフェースの外に排出される。付加イオンは更に第 2 細孔 14 を経て質量分析計に入り、マススペクトルを与える。

本実施例では、2種の液 (メタノールとクロロホルム) を用いたが、2種以上でもさしつかえない。また、クロロホルムを予めメタノールなどの溶媒に混合してお

いてもよい。すなわち、何らかの手段で含ハロゲン化合物（溶媒）と極性溶媒を混合させればよい。

第7図にはLCによる分離後のAPCIインターフェースに導入する前にクロロホルムを混合するポストカラムの構成図である。

メタノールはポンプ3で送り出され、インジェクタ6、カラム7を経てミキサー5に到る。クロロホルムはポンプ4で送り出され、ミキサー5でメタノール溶液と混合されAPCIインターフェースに送られる。この場合カラムにクロロホルムを流さない系が実現できる。

#### 【発明の効果】

本発明によれば、溶液状態ではハロゲンイオンが存在せず、ポンプ、カラムなどの腐蝕を防ぎ、かつ、LCの分離を損うことのないLC条件をつくることができる。更にイオン源でハロゲンイオン付加イオンを容易に生成させることができるので、信頼性の高い分析を行なうことができる。

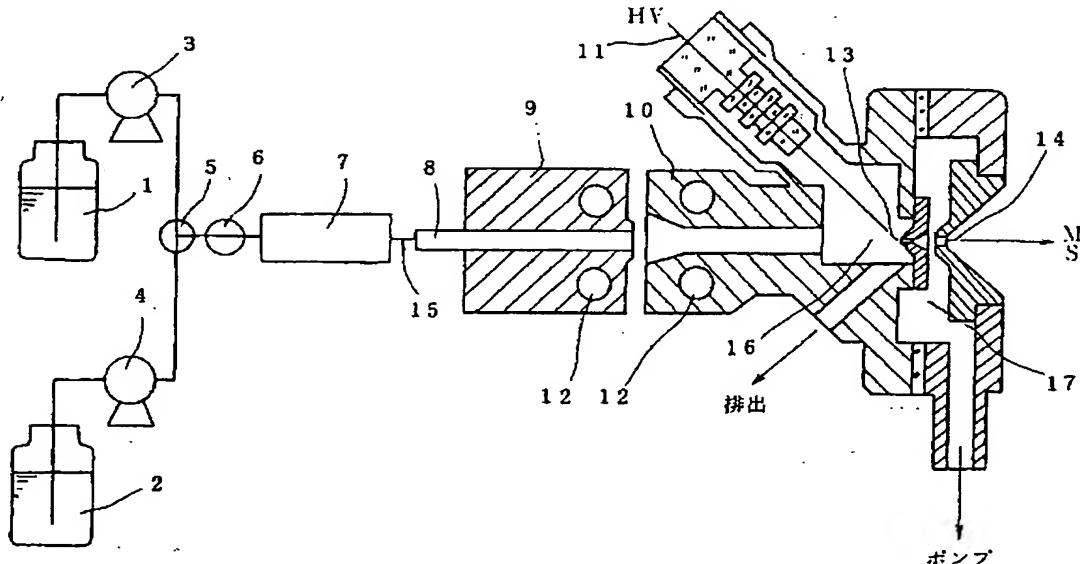
#### 【図面の簡単な説明】

第1図に本発明の構成図、第2図はメタノールの負イオ

ン大気圧化学イオン化（NI-APCI）マススペクトル、第3図はクロロホルム：メタノール（5:95）溶液のNI-APCIマススペクトル、第4図は1  $\mu$  gのSucroseを導入したクロロホルム：メタノール（5:95）溶液のNI-APCIマススペクトル、第5図は5%四塩化炭素、塩化メチレン、クロロホルム-メタノールの各溶媒を使用した時のSucrose [M+Cl]<sup>-</sup>イオンの応答を示すマススペクトル、第6図Aは0.05%, 0.5%, 5%クロロホルム-アセトニトリル溶液に対するSucrose [M+Cl]<sup>-</sup>の応答を、第6図は0.5%クロロホルム-アセトニトリル溶液に対する糖の [M+Cl]<sup>-</sup>の応答を示す曲線図、第7図はポストカラムの一例を示す構成図である。

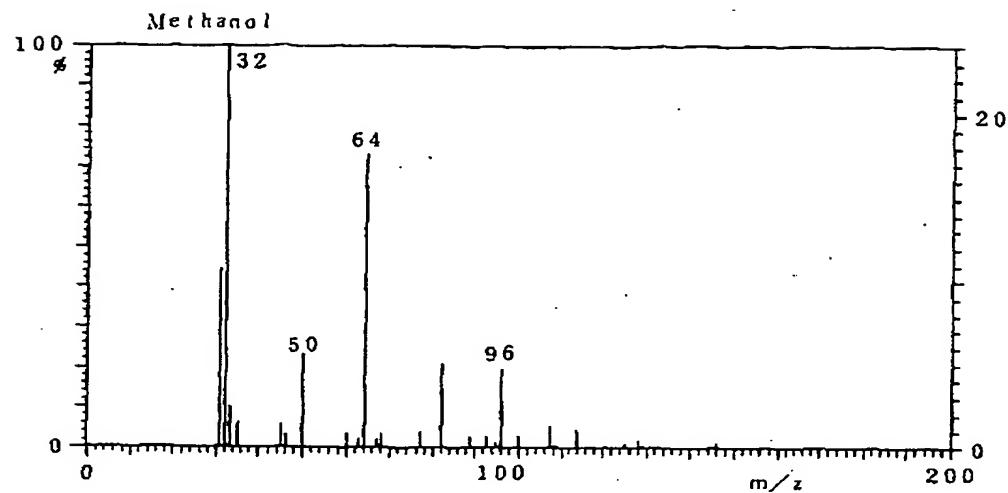
1 … 溶媒貯蔵ビン、2 … 溶媒貯蔵ビン、3 … ポンプ、4 … ポンプ、5 … ミキサー、6 … インジェクタ、7 … カラム、8 … キャビラリー、9 … 霧化器、10 … 脱溶媒室、11 … ニードル電極、12 … カートリッジヒータ、13 … 第1細孔、14 … 第2細孔、15 … プラスチックチューブ、16 … 大気圧化学イオン源、17 … 差動排気系部。

【第1図】

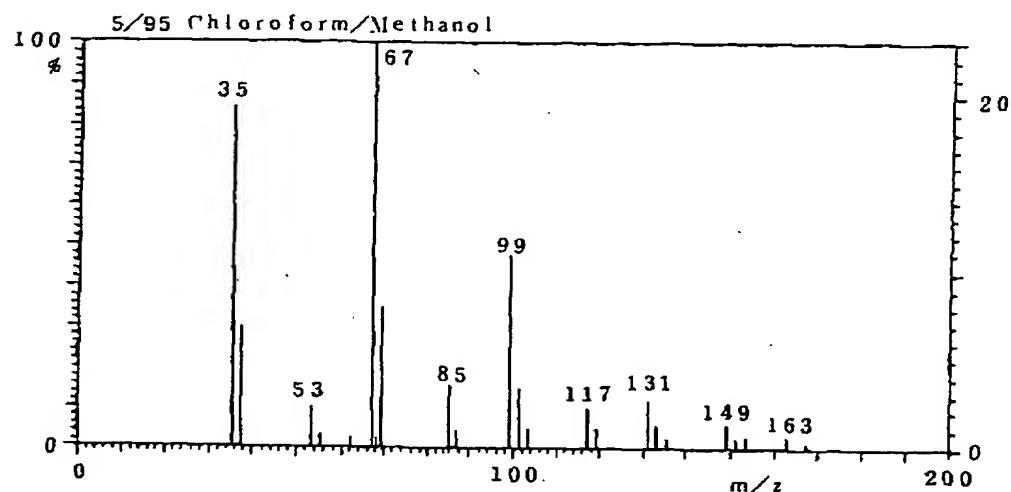


1 … 溶媒貯蔵ビン	2 … 溶媒貯蔵ビン	3 … ポンプ	4 … ポンプ
5 … ミキサー	6 … インジェクタ	7 … カラム	8 … キャビラリー
9 … 霧化器	10 … 脱溶媒室	11 … ニードル電極	12 … カートリッジヒータ
13 … 第1細孔	14 … 第2細孔	15 … プラスチックチューブ	16 … 大気圧化学イオン源
17 … 差動排気系部			

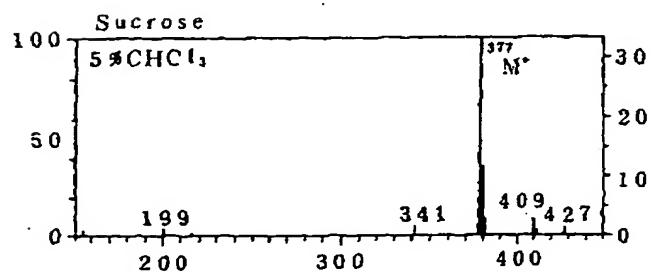
【第2図】



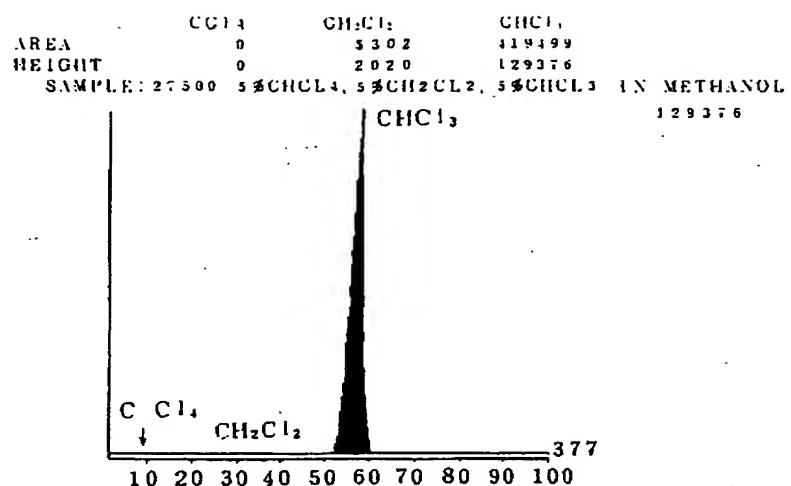
【第3図】



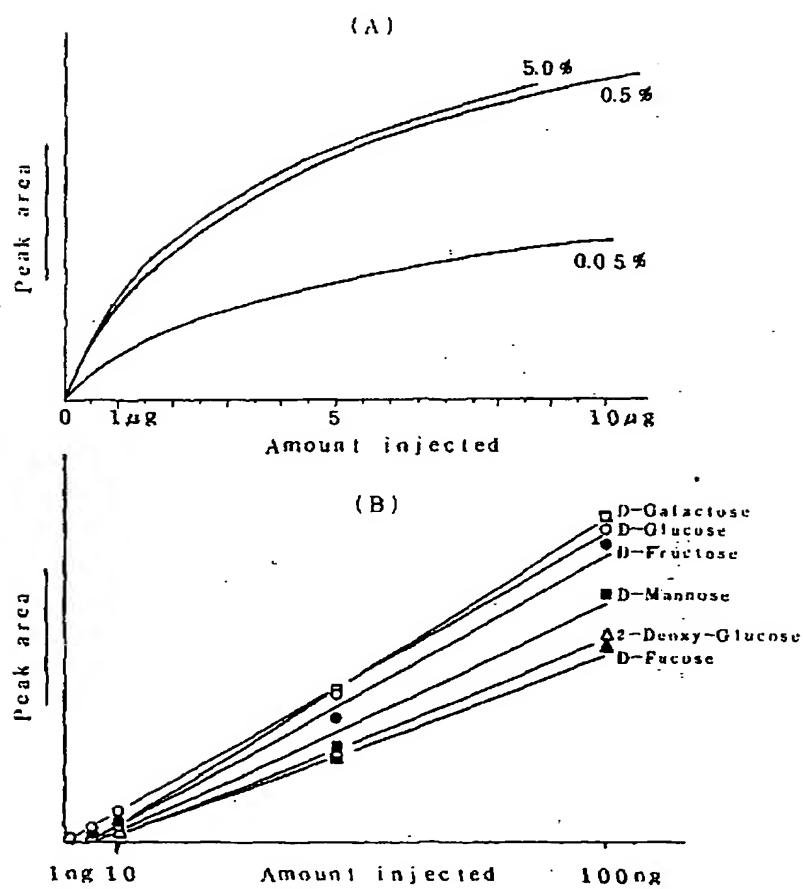
【第4図】



【第5図】



### 【第6図】



【第7図】

